

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

Bureau International

## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 6 : COTE 14/205, A61K 39/106, C07K 16/12, A61K 39/440, G01N 33/569	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/12905 (13) Date de dépôt international: 4 octobre 1996 (04.10.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01552 (22) Date de dépôt international: 4 octobre 1995 (04.10.95) FR	(12) Etats dédiés: AU, CA, CN, HU, JP, MX, NO, NZ, US, brevet déposé (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(20) Demandes relatives à la priorité: 95/11890 4 octobre 1995 (04.10.95) FR	Publise Avec rapport de recherche internationale. Avec l'explication du délai prévu pour la modification des revendications, sera républiée si de telles modifications sont reçues.	
(71) Déposant (pour tous les Etats dédiés sauf US): PASTEUR MERIEUX SERUMS & VACCINS (FR/FRA), 58, avenue Lacoste, Boite postale 7046, F-69348 Lyon Cedex 07 (FRA). (72) Inventeur(s): LISSOLOL, Ling (FR/FRA), 691, rue du Vallon, F-69720 Marcy-l'Ecole (FRA). (74) Mandataire: AYROLLES, Marie-Pascale, Pasteur Méruix Sérum & Vaccins, Direction Propriété Industrielle, 58, avenue Lacoste, F-69348 Lyon Cedex 07 (FRA).		
(54) Titre: NOVEL MEMBRANE PROTEINS OF HELICOBACTER PYLORI (54) Thème: NOUVELLES PROTÉINES MÉMORIAINAIRES D'HELICOBACTER PYLORI		
(57) Abstract The invention relates to a protein of <i>Helicobacter pylori</i> in a substantially purified form, susceptible of being obtained from a membrane fraction of <i>H. pylori</i> and of which the molecular weight after electrophoresis on polyacrylamide gel 10 % in the presence of SDS is approximately 54, 50, 32-33 or 30 kDa. (57) Résumé L'invention a pour objet une protéine d' <i>H. pylori</i> sous forme substantiellement purifiée, susceptible d'être obtenue à partir d'une fraction membranaire d' <i>H. pylori</i> et dont le poids moléculaire après électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10 % en présence de SDS apparaît de l'ordre de 54, 50, 32-33 ou 30 kDa.		

BEST AVAILABLE COPY

BEST AVAILABLE COPY

## UNIQUEMENT À TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu de PCT.

AT	Autriche	CA	République-Unie du Canada	HR	Indonésie
AT	Autriche	CH	Chypre	HT	Haïti
AU	Australie	CO	Colombie	IL	Irak
BB	Bahamas	CR	Costa Rica	IN	Iran
BE	Belgique	CU	Cuba	JO	Jordanie
BR	Bresil	DK	Danemark	KR	Corée du Sud
CA	Canada	DO	Dominique	KZ	Kazakhstan
CL	Chili	ES	Espagne	LK	Sri Lanka
CO	Colombie	FI	Finlande	LV	Lettonie
CR	Costa Rica	FO	Faroe Islands	MK	Moldavie
DE	Allemagne	GR	Greece	ML	Maldives
DK	Danemark	GT	Guatemala	MT	Mauritanie
DO	Dominique	HN	Honduras	MY	Myanmar
ES	Espagne	ID	Indonésie	NL	Néerlandais
FI	Finlande	IQ	Iraq	NO	Norvège
FO	Faroe Islands	IS	Icelande	NP	Népal
GR	Greece	LT	Lithuanie	NI	Nicaragua
GT	Guatemala	LU	Luxembourg	NL	Néerlandais
ID	Indonésie	MD	Moldavie	NO	Norvège
IQ	Iraq	ME	Mongolie	NP	Népal
IS	Icelande	MT	Mauritanie	OM	Oman
LU	Luxembourg	MR	Mauritanie	PA	Panama
MD	Moldavie	MT	Mauritanie	PE	Perou
ME	Mongolie	MR	Mauritanie	PH	Philippines
MT	Mauritanie	MR	Mauritanie	PL	Pologne
MR	Mauritanie	MT	Mauritanie	PT	Portugal
MR	Mauritanie	MR	Mauritanie	RU	Russie
MR	Mauritanie	RU	Russie	SA	Saoud
MR	Mauritanie	RU	Russie	SL	Saint-Louis
MR	Mauritanie	RU	Russie	SV	Salvador
MR	Mauritanie	RU	Russie	TR	Turquie
MR	Mauritanie	RU	Russie	VE	Venezuela
MR	Mauritanie	RU	Russie	ZW	Zimbabwe

NOUVELLES PROTEINES MEMBRANAIRES D'*HELICOBACTER PYLORI*

La présente invention a pour objet des protéines d'*Helicobacter pylori* nouvellement obtenues sous forme substantiellement purifiées, ainsi que les compositions pharmaceutiques qui les contiennent.

*Helicobacter* est un genre bactérien caractérisé par des bactéries spirales à gram négatif. Plusieurs espèces colonisent le tractus gastrointestinal des mammifères. On cite en particulier *H. pylori*, *H. heilmannii*, *H. felis* et *H. mustelae*. Bien que *H. pylori* soit l'espèce la plus communément associée aux infections humaines, dans certains cas certes rares, *H. heilmannii* et *H. felis* ont pu être isolés chez l'homme.

*Helicobacter* infecte plus de 50 % de la population adulte dans les pays développés et près de 100 % de celle des pays en voie de développement ; ce qui en fait un des agents infectieux prédominants au plan mondial.

*H. pylori* est retrouvée exclusivement à ce jour à la surface de la muqueuse de l'estomac chez l'homme et plus particulièrement autour des lésions de cratère des ulcères gastriques et duodénaux. Cette bactérie est à l'heure actuelle reconnue comme l'agent étiologique des gastrites antrales et apparaît comme un des cofacteurs requis pour le développement des ulcères. Par ailleurs, il semble que le développement des carcinomes gastriques puisse être associé à la présence d'*H. pylori*.

Il apparaît donc hautement souhaitable de mettre au point un vaccin en vue de prévenir ou de traiter les infections à *H. pylori*. Un tel vaccin serait très probablement de nature sous-unitaire.

Différentes protéines d'*H. pylori* ont été caractérisées ou isolées à ce jour. Il s'agit notamment de l'uréase, composée de deux sous-unités A et B de 30 et 67 kDa respectivement (Hu & Mobley, Infect. Immun. (1990) 58 : 992 ; Dunn et al, J. Biol. Chem. (1990) 265 : 9464 ; Evans et al, Microbial Pathogenesis (1991) 10 : 15 ; Labigne et al, J. Bact. (199) 173 : 1920) ; de la cytotoxine vacuolaire de 87 kDa (V<sub>a</sub>CA) (Cover & Blaser, J. Biol. Chem. (1992) 267 : 10570 ; Phadnis et al, Infect. Immun. (1994) 62 : 1557 ; WO 93/18150) ; d'un antigène immunodominant de 128 kDa associé à la cytotoxine (CagA, also called TagA) (WO 93/18150 ; USP 5 403 924) ; des heat shock protéines HspA et

HspB de 13 et 58 kDa respectivement (Suerbaum et al, Mol. Microbiol. (1994) 14 : 959 ; WO 93/18150) ; d'une catalase de 54 kDa (Hazell et al, J. Gen. Microbiol. (1991) 137 : 57) ; d'une hémagglutinine fibrillaire (HpaA) de 20kDa ; d'une protéine de 15 kDa riche en histidine (Hpn) (Gibert et al, Infect. Immun. (1995) 63 : 2682) ; d'une protéine de la membrane externe de 30 kDa (Bolin et al, J. Clin. Microbiol. (1995) 33 : 381) ; d'une lipoprotéine de 20 kDa associée à la membrane (Kostremska et al, J. Bact. (1994) 176 : 5938) ainsi que d'une famille de protéines HopA, HopB, HopC et HopD, de poids moléculaires compris entre 48 et 67 kDa (Exner et al, Infect. Immun. (1995) 63 : 1367).

Certaines de ces protéines ont déjà été proposées comme antigènes vaccinaux potentiels. En particulier, l'uréase est reconnue comme étant un antigène de premier choix pouvant être utilisé à cette fin (WO 94/9823 ; WO95/3824 ; WO 95/22987 ; Michetti et al, Gastroenterology (1994) 107 : 1002). Il reste que la recherche de nouveaux antigènes doit être poursuivie, notamment dans la mesure où l'on prévoit que, pour obtenir un effet vaccinal optimisé, plusieurs antigènes devront être vraisemblablement incorporés dans un vaccin.

En résumé, il apparaît toujours nécessaire d'identifier des antigènes supplémentaires en vue de les incorporer dans un vaccin à forte efficacité.

C'est pourquoi l'invention a notamment pour objet une protéine d'*H. pylori* sous forme substantiellement purifiée, susceptible d'être obtenue à partir d'une fraction membranaire d'*H. pylori*, et dont le poids moléculaire après électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10 % en présence de SDS, appartiendra à l'ordre de 54, 50, 32-35 ou 30 kDa. Lorsque la protéine a un poids moléculaire d'environ 54 kDa on précise en outre qu'elle ne réagit pas avec un antisérum anti-catalase.

Un antisérum anti-catalase d'*H. pylori* peut être notamment préparé selon le procédé d'immunisation décrit dans l'Exemple 5 ci-après, en utilisant une préparation de catalase obtenue par chromatographie, tel que décrit dans l'Exemple 6.

Par "forme substantiellement purifiée", on entend que la protéine est séparée de l'environnement dans lequel elle existe de manière naturelle. Entre autres, il peut s'agir d'une préparation notamment dépourvue des protéines cytoplasmiques et périplasmiques d'*H. pylori*.

La protéine membranaire dont le poids moléculaire apparent est de l'ordre de 54 kDa est susceptible d'être obtenue par un procédé dans lequel :

- 5 (i) on procède à une extraction des bactéries *H. pylori* par du n-octyl β-D glucopyranoside 1%, suivie d'une centrifugation ;
- (ii) on récupère un culot bactérien que l'on traite par du lysozyme et que l'on soumet à sonication, suivie d'une centrifugation ;
- 10 (iii) on récupère un culot de centrifugation que l'on soumet à un lavage en tampon Tris HCl 20 mM pH 7,5, suivi d'une centrifugation ;
- (iv) on récupère la fraction membranaire constituée du culot de centrifugation que l'on resuspend en milieu aqueux, avantageusement en tampon carbonate pH 9,5 contenant 5 % de zwitsergent 3-14 ;
- 15 (v) on soumet la fraction membranaire à une chromatographie échangeuse d'anions sur colonne Q-Sépharose en gradient de NaCl 0 - 0,5 M, avantageusement dans un tampon carbonate pH 9,5 à 0,1 % de zwitsergent 3-14, suivi d'un lavage en NaCl 1 M, avantageusement dans un tampon carbonate pH 9,5 à 0,1 % de zwitsergent 3-14 ;
- (vi) on récupère la fraction élue en début de lavage en NaCl 1 M que l'on soumet à une chromatographie échangeuse d'anions sur colonne de DEAE Sépharose en gradient de NaCl 0 - 0,5 M, avantageusement en tampon Tris-HCl pH 7,5 à 0,1 % de zwitsergent 3-14 (de manière avantageuse, la fraction en NaCl 1 M est d'abord dialysée contre du tampon Tris-HCl pH 7,5 à 0,1 % de zwitsergent 3-14) ; et
- 20 (vii) on récupère la fraction élue en NaCl 0,1 - 0,25 M.

La protéine membranaire dont le poids moléculaire apparent est de l'ordre de 50 kDa est susceptible d'être obtenue par un procédé dans lequel :

- 25 (i) on procède à une extraction des bactéries *H. pylori* par du n-octyl β-D glucopyranoside 1%, suivie d'une centrifugation ;

- (ii) on récupère un culot bactérien que l'on traite par du lysozyme et que l'on soumet à sonication, suivie d'une centrifugation ;
- 5 (iii) on récupère un culot de centrifugation que l'on soumet à un lavage en tampon Tris HCl 20 mM pH 7,5, suivi d'une centrifugation ;
- (iv) on récupère la fraction membranaire constituée du culot de centrifugation que l'on resuspend en milieu aqueux, avantageusement en tampon carbonate pH 9,5 contenant 5 % de zwitsergent 3-14 ;
- 10 (v) on soumet la fraction membranaire à une chromatographie échangeuse d'anions sur colonne Q-Sépharose en gradient de NaCl 0 - 0,5 M, avantageusement dans un tampon carbonate pH 9,5 à 0,1 % de zwitsergent 3-14, suivi d'un lavage en NaCl 1 M, avantageusement dans un tampon carbonate pH 9,5 à 0,1 % de zwitsergent 3-14 ;
- (vi) on récupère la fraction élue en début de lavage en NaCl 1 M que l'on soumet à une chromatographie échangeuse d'anions sur colonne de DEAE Sépharose en gradient de NaCl 0 - 0,5 M, avantageusement en tampon Tris-HCl pH 7,5 à 0,1 % de zwitsergent 3-14 (de manière avantageuse, la fraction en NaCl 1 M est d'abord dialysée contre du tampon Tris-HCl pH 7,5 à 0,1 % de zwitsergent 3-14) ; et
- 15 (vii) on récupère la fraction élue en NaCl 0,3 - 0,4 M.

La protéine membranaire dont le poids moléculaire apparent est de l'ordre de 30 kD est susceptible d'être obtenue par un procédé dans lequel :

- 20 (i) on procède à une extraction des bactéries *H. pylori* par du n-octyl β-D glucopyranoside 1%, suivie d'une centrifugation ;
- (ii) on récupère un culot bactérien que l'on traite par du lysozyme et que l'on soumet à sonication, suivie d'une centrifugation ;

- (iii) on récupère un culot de centrifugation que l'on soumet à un lavage en tampon Tris HCl 20mM pH 7,5, suivi d'une centrifugation ;
  - 5 (iv) on récupère la fraction membranaire constituée du culot de centrifugation que l'on resuspend en milieu aqueux, avantagereusement en tampon carbonate pH 9,5 contenant 5 % de zwittergent 3-14 ;
  - 10 (v) on soumet la fraction membranaire à une chromatographie échangeuse d'anions sur colonne Q-Sépharose en gradient de NaCl 0 - 0,5M, avantagereusement dans un tampon carbonate pH 9,5 à 0,1 % de zwittergent 3-14 ;
  - 15 (vi) on récupère la fraction élue en NaCl 0,28 - 0,35M, que l'on soumet à une chromatographie échangeuse d'anions sur colonne de DEAE Sépharose en gradient de NaCl 0 - 0,5M, avantagereusement en tampon Tris-HCl pH 7,5 à 0,1 % de zwittergent 3-14 (de manière avantagereuse, la fraction en NaCl 1 M est d'abord dialysée contre du tampon Tris-HCl pH 7,5 à 0,1 % de zwittergent 3-14) ; et
  - 20 (vii) on récupère la fraction correspondant à l'état direct (absence de NaCl).
- La protéine membranaire dont le poids moléculaire apparent est de l'ordre de 32-35 kDa est susceptible d'être obtenue par un procédé dans lequel :
- 25 (i) on procède à une extraction des bactéries *H. pylori* par du n-octyl β-D glucopyranoside 1%, suivie d'une centrifugation ;
  - (ii) on récupère un culot bactérien que l'on traite par du lysozyme et que l'on soumet à sonication, suivie d'une centrifugation ;
  - 30 (iii) on récupère un culot de centrifugation que l'on soumet à un lavage en tampon Tris HCl 20 mM pH 7,5, suivi d'une centrifugation ;
  - (iv) on récupère la fraction membranaire constituée du culot de centrifugation que l'on resuspend en milieu aqueux, avantagereusement en tampon carbonate pH 9,5 ;

- (v) on centrifuge la suspension obtenue en (iv) à environ 200 000 xg et on récupère le surnageant ;
- 5 (vi) on abaisse le pH du surnageant obtenu en (v) jusqu'à environ pH 7, avantagereusement par dialyse contre du tampon phosphate pH 7 ;
- (vii) on soumet la préparation obtenue en (vi) à une chromatographie échangeuse de cations sur colonne de SP-Sépharose en gradient de NaCl 0 - 0,5 M, avantagereusement dans un tampon phosphate pH 7 ; et
- 10 (viii) on récupère la fraction élue en NaCl 0,26 - 0,31 M.

Les protéines de 54, 50, 32 et 30 kDa selon l'invention sont vraisemblablement des protéines membranaires intrinsèques ou des protéines associées à la membrane. La protéine de 54 kDa ne réagit pas avec des anticorps anti-catalase, ni en western blot, ni en dot blot. La protéine de 30 kDa ne réagit pas avec des anticorps anti-sous-unité A de l'uridase, ni en western blot, ni en dot blot. La protéine de 32 kDa s'avère être une protéine alcaline ; son poids moléculaire peut apparaître légèrement supérieur e.g. de l'ordre de 35 kDa dans certaines conditions expérimentales.

20 La séquence N-terminale de la protéine de 50 kDa d'une souche d'*H. pylori* (ATCC 43579) est comme suit (code une lettre) : MKEKFNRTPHVNIGTIGHVDH. Cette information n'exclut pas le fait que des protéines équivalentes susceptibles d'être purifiées selon le procédé indiqué ci-dessus puissent avoir une séquence N-terminale légèrement différente, dans la mesure où elles seraient dérivées d'une autre souche bactérienne. Une telle différence refléterait en effet le phénomène de varience allélique communément rencontré au sein d'une même espèce. Par exemple, une espèce bactérienne est usuellement représentée par un ensemble de souches qui diffèrent entre elles par des caractéristiques alléliques mineures. Un polypeptide qui remplit la même fonction biologique dans différentes souches peut avoir une séquence d'acides aminés qui n'est pas la même pour toutes les souches. Une telle variation allélique se retrouve également au niveau de l'ADN.

Les différences alléliques au niveau de la séquence d'acides aminés peuvent être constituées par une ou plusieurs substitutions, délétions ou additions d'acides aminés, qui n'affectent pas la fonction biologique.

Par "fonction biologique" on entend la fonction de la protéine qui participe à la survie des cellules dans lesquelles la protéine existe de manière naturelle (même si la fonction n'est pas absolument indispensable). Par exemple, la fonction d'une porine est de permettre à des composés présents dans le milieu extérieur d'entrer à l'intérieur de la cellule. La fonction biologique est distincte de la fonction antigénique. Une protéine peut avoir plus d'une fonction biologique.

L'invention a aussi pour objet une protéine sous forme substantiellement purifiée et susceptible d'avoir été purifiée selon un des procédés décrits ci-dessous à partir d'une bactérie du genre *Helicobacter* e.g., *H. pylori*, *H. heilmanni*, *H. felis* et *H. mustelae*.

L'invention a également pour objet tout autre protéine ou polypeptide, sous forme substantiellement purifiée, dans la mesure où il est analogue en terme d'antigénicité à une protéine d'*Helicobacter* susceptible d'être purifiée selon l'un des procédés décrits ci-dessous. Pour ce qui concerne les polypeptides, il s'agit notamment de polypeptides dérivés par fragmentation ou par mutation d'un ou plusieurs acides aminés, e.g. par délétion, addition ou substitution, d'une protéine qui existe dans la nature et dont la forme purifiée peut être obtenue selon l'un des procédés décrits ci-dessous. De tels polypeptides peuvent être notamment obtenus par digestion enzymatique à l'aide de protéases telles que la pepsine ou la trypsin. Il n'est pas nécessaire que de tels polypeptides puissent être purifiés selon l'un des procédés décrits ci-dessous.

La présente description fait usage des termes "protéine" et "polypeptide" indépendamment de la taille des molécules (longueur de la chaîne d'acides aminés) et des éventuelles modifications post-traductionnelles. Dans la suite de la description le terme "polypeptide" est réservé pour désigner un produit dérivé d'une protéine par fragmentation ou mutation.

Une protéine ou un polypeptide selon l'invention doit être capable d'être reconnu par des anticorps monospécifiques établis à l'encontre d'une protéine d'*Helicobacter* susceptible d'être purifiée selon l'un des procédés décrits ci-dessous. Cette antigénicité spécifique peut être révélée selon un certain nombre de méthodes ; par exemple par Western blot (Towbin et al. PNAS (1979) 76 : 4350), dot blot et ELISA.

En Western blot, le produit destiné à être testé, e.g. soit sous forme de préparation purifiée, soit sous forme d'extrait bactérien, est soumis à une électrophorèse en gel de SDS-

Page (polyacrylamide 10%) tel que décrit par Laemmli U.K., Nature (1970) 227 : 680. Après transfert sur une membrane de nitrocellulose, cette dernière est incubée avec un sérum hyperimmun monospécifique dilué dans la gamme des dilutions de 1 : 50 à 1 : 5000, de préférence de 1 : 100 à 1 : 500. L'antigénicité spécifique est démontrée dès qu'une bande correspondant au produit testé présente une réactivité à une des dilutions comprises dans la gamme établie ci-dessus.

En ELISA, le produit destiné à être testé est de préférence utilisé pour recouvrir les puits. On préfère utiliser une préparation purifiée, bien qu'un extrait total puisse être aussi utilisé. En bref, 100 µl d'une préparation à 10 µg de protéine/ml sont distribués dans les puits d'une plaque de 96 puits. La plaque est incubée 2 hrs à 37°C puis une nuit à 4°C. La plaque est lavée avec du tampon PBS (phosphate buffer saline) contenant 0,05 % de Tween 20 (tampon PBS/Tween). Les puits sont saturés avec 250 µl de PBS contenant 1 % de sérum albumine bovine (BSA). On laisse incuber 1 hr à 37°C puis la plaque est lavée avec du tampon PBS/Tween. Un antisérum de lapin monospécifique est dilué en série dans du tampon PBS/Tween contenant 0,5 % de BSA. Cent µl d'une dilution sont ajoutés à chaque puit. La plaque est incubée 90 min à 37°C puis lavée. La plaque est révélée selon des méthodes standards. Par exemple, un conjugué peroxydase-immunoglobuline de chèvre anti-immunoglobulines de lapin est ajouté dans les puits. L'incubation est poursuivie 90 min à 37°C puis la plaque est lavée. On développe la réaction avec le substrat approprié. La réaction est mesurée par colorimétrie (absorbance mesurée par spectrophotométrie). Dans ces conditions, une réaction positive est observée lorsque une valeur de DO de 1 est associée à une dilution d'au moins 1 : 50, de préférence d'au moins 1 : 500. La longueur d'onde appropriée à laquelle on mesure la densité optique dépend du substrat.

En dot blot, on préfère utiliser une préparation purifiée du produit à tester, bien qu'un extrait total puisse être aussi utilisé. En bref, une préparation du produit à tester à 100 µg de protéine/ml est diluée en série deux fois dans du Tris-HCl 50 mM pH 7,5. Cent µl de chaque dilution sont appliqués sur une membrane de nitrocellulose 0,45 µm dans un appareil de dot blot à 96 puits (Biorad). Le tampon est éliminé par mise sous vide. Les puits sont lavés par ajout de Tris-HCl 50 mM pH 7,5 et la membrane est séchée à l'air. La membrane est saturée par du tampon bloquant (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 0,15 M, lait écrémé 10 g/l) puis incubée avec un antisérum monospécifique dilué dans la gamme de 1 : 50 à 1 : 5000, de préférence de 1 : 50 à 1 : 500. La réaction est révélée selon des méthodes standards. Par exemple, un conjugué peroxydase-immunoglobuline de chèvre anti-immunoglobulines de lapin est ajouté dans les puits. L'incubation est poursuivie 90 min à

37°C puis la plaque est lavée. On développe la réaction avec le substrat approprié. La réaction est mesurée par colorimétrie ou chimiluminescence. Dans ces conditions, une réaction est positive lorsque l'on observe une coloration au niveau du dépôt sur la feuille de nitrocellulose directement pour révélation par colorimétrie ou sur film photographique pour révélation par chimiluminescence, associée à une dilution d'au moins 1 : 50, de préférence d'au moins 1 : 500.

Selon un mode particulier, une protéine selon l'invention peuvent être notamment obtenue par purification à partir d'*Helicobacter* ou exprimée par voie recombinante dans un système hétérologue (ce qui peut être aussi le cas pour un polypeptide selon l'invention). Dans ce dernier cas, la protéine peut présenter des modifications post-productionnelles qui ne soient pas identiques à celles de la protéine correspondante issue de la souche d'origine.

L'efficacité thérapeutique ou prophylactique d'une protéine ou d'un polypeptide selon l'invention peut être évalué selon des méthodes standards ; par exemple en mesurant l'induction d'une réponse immunitaire mucosale ou l'induction d'une réponse immunitaire à effet thérapeutique ou protecteur en utilisant e.g. le modèle souris / *H. felis* et les procédures décrites dans Lee et al, Eur. J. Gastroenterology & Hepatology, (1995) 2 : 303 ou Lee et al, J. Infect. Dis. (1995) 172 : 161, à condition de prendre la précaution suivante :

15 Lorsque la protéine est originaire d'une espèce autre que *H. felis*, la souche d'*H. felis* doit remplacée par une souche d'*Helicobacter* appartenant à l'espèce dont la protéine est originaire et adaptée à cet effet (les autres conditions expérimentales restant identiques). Par exemple, on teste la capacité d'un polypeptide dérivé par fragmentation d'une protéine d'*H. pylori*, à induire un effet protecteur ou thérapeutique, en substituant une souche d'*H. pylori*. Une telle souche est proposée par e.g. Kleanthous et al, Abstr. presented at the VIIIth International Workshop on Gastroesophageal Pathology 7-9th July 1995, Edinburgh, Scotland. Un effet protecteur est constaté dès lors qu'une infection dans le tissu gastrique est moindre par rapport à un groupe contrôle. L'infection est évaluée en testant l'activité uréase, la charge bactérienne ou l'infiltration leucocytaire. Par exemple, lorsque l'on constate après épreuve, une réduction de l'activité uréase dans le tissu gastrique, même si elle n'est pas complètement abolie on est en droit d'affirmer qu'il y a protection partielle.

20

25

30

Par conséquent l'invention concerne également (i) une composition de matière comprenant une protéine ou un polypeptide selon l'invention et un diluant ou un support ; en particulier (ii) une composition pharmaceutique notamment destinée à la prévention ou au traitement d'une infection à *Helicobacter*, qui comprend à titre de principe actif une

protéine ou un polypeptide selon l'invention, en quantité efficace d'un point de vue prophylactique ou thérapeutique ; (iii) l'usage d'une protéine ou un polypeptide selon l'invention à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique ; (iv) l'usage d'une protéine ou un polypeptide selon l'invention pour la fabrication d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement d'une infection à *Helicobacter* ; ainsi qu'(v) une méthode d'induction d'une réponse immunitaire à l'encounter d'*Helicobacter* e.g., *H. pylori*, *H. heilmannii*, *H. felis* et *H. mustelae* chez un mammifère, selon laquelle on administre audit mammifère une quantité efficace d'un point de vue immunologique d'une protéine ou d'un polypeptide selon l'invention afin de développer une réponse immunitaire ; en particulier (vi) une méthode de prévention ou de traitement d'une infection à *Helicobacter* où on administre à un individu une quantité prophylactiquement ou thérapeutiquement efficace d'une protéine ou d'un polypeptide selon l'invention.

Les méthodes et les compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent traiter ou prévenir des infections à *Helicobacter* et par conséquent, les maladies gastro-intestinales associées à de telles infections. Il s'agit en particulier, des gastrites aigües chroniques et atrophiques ; des ulcères peptiques e.g. des ulcères gastriques et duodénaux ; des cancers gastriques ; des dyspepsies chroniques ; des dyspepsies non-ulcératrices réfractaires ; des métaplasies intestinales et certains lymphomes ( e.g. low grade MALT lymphoma).

Une composition selon l'invention peut être administrée par n'importe quelle voie conventionnelle en usage dans le domaine des vaccins, en particulier au travers d'une surface mucosale (e.g. oculaire, nasale, orale, gastrique, intestinal, rectale, vaginale, ou du tractus urinaire) ou par voie parentérale (e.g. sous-cutanée, intradermique, intramusculaire, intraveineuse, ou intrapéritonéale). Le choix de la voie d'administration dépend d'un certain nombre paramètres tel que l'adjuvant associé à la protéine ou au polypeptide selon l'invention. Par exemple, si un adjuvant mucosal est utilisé, on préférera la voie nasale ou orale. Si on utilise une formulation lipidique, on choisira la voie parentérale, de préférence la voie sous-cutanée ou intramusculaire.

Une composition selon l'invention peut comprendre outre une protéine ou un polypeptide selon l'invention, au moins un autre antigène d'*Helicobacter* tel que l'apoenzyme de l'uréase, ou une sous-unité, fragment, homologue, mutant ou dérivé de cette uréase.

Pour usage dans une composition selon l'invention, une protéine ou un polypeptide selon l'invention peut être formulé dans ou avec des liposomes, de préférence des liposomes neutres ou anioniques, des microsphères, des ISCOMs ou des pseudo-particules virales (VLPs), afin de favoriser le ciblage de la protéine ou du polypeptide ou d'augmenter la réponse immunitaire. L'homme du métier dispose de ces composés sans difficulté : par exemple voir Liposomes : A Practical Approach, RRC New ED, IRL press (1990).

Des adjuvants autres que les liposomes peuvent être aussi utilisés. Un grand nombre sont connus de l'homme du métier. De tels adjuvants sont référencés ci-après :

10 Pour administration parentérale, on cite notamment des composés d'aluminium tels que l'hydroxyde d'aluminium, le phosphate d'aluminium et l'hydroxyphosphate d'aluminium. L'antigène peut être adsorbé ou précipité sur un composé d'aluminium selon des méthodes standards. D'autres adjuvants tels que le RIBI d'ImmunoChem (Hamilton, MT) peuvent être utilisés pour administration parentérale.

20 Pour administration mucosale, on cite notamment les toxines bactériennes e.g. la toxine cholérique (CT), la toxine d'*E. coli* labile à la chaleur (LT) la toxine de *Clostridium difficile* et la toxine *pertussis* (PT) ainsi que les formes détoxifiées (sous-unité, toxoid ou mutant) de ces toxines. Par exemple, une préparation contenant la sous-unité B de la CT (CTB) et en quantité moindre de la CT peut être utilisée. Des fragments, des homologues et des dérivés de ces toxines sont de même appropriés dans la mesure où ils conservent une activité adjuvante. De préférence, on utilise un mutant ayant une toxicité réduite. De tels mutants sont décrits e.g. dans WO 95/17211 (Arg-7-Lys CT mutant), WO 95/34323 (Arg-23 9-Lys Glu-129-Gly PT mutant) et WO 96/6627 (Arg-192-Gly LT mutant). D'autres adjuvants tels que le lipopolysaccharide bactérien majeur (MPLA) de e.g. *E. coli*, *Salmonella minnesota*, *Salmonella typhimurium* ou *Shigella flexneri*, peuvent être utilisés pour administration mucosale.

30 Des adjuvants utiles à la fois pour administration mucosale et parentérale, incluent notamment le polyphosphazène (WO 95/2415), le DC-chol (3 béta-[N-(N,N'-diméthyl aminométhane)-carbamoyl] cholestérol) (USP 5 283 185 et WO 96/14831) et le QS-21 (WO 88/9336).

35 L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois après un certain délai. Le dosage approprié varie en fonction de divers paramètres, par exemple,

de l'individu traité (adulte ou enfant) de l'antigène vaccinal lui-même du mode et de la fréquence d'administration, de la présence ou absence d'adjuvant et si présent, du type d'adjuvant et de l'effet désiré (e.g. protection ou traitement), comme cela peut être déterminé par l'homme de l'art. En général, un antigène selon l'invention peut être administré en quantité allant de 10 µg à 500 mg, de préférence de 1 mg à 200 mg. En particulier, on indique qu'une dose parentérale ne doit pas excéder 1 mg, de préférence 100 µg. Des doses plus fortes peuvent être prescrites pour e.g. usage oral. Indépendamment de la formulation, la quantité de protéine administrée à l'homme par voie orale est par exemple, de l'ordre de 1 à 10 mg par prise, et l'on préconise au moins 3 prises à intervalle de 4 semaines.

Une composition selon l'invention peut être fabriquée de manière conventionnelle. En particulier on associe une protéine ou un polypeptide selon l'invention avec un diluant ou un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique e.g. de l'eau ou une solution saline tel qu'un tampon de sel de phosphate (PBS), complémenté de manière optionnelle avec un sel de bicarbonate tel que du bicarbonate de sodium e.g. 0,1 à 0,5 M lorsque la composition est destinée à l'administration orale ou intragastrique. En général, le diluant ou le support est sélectionné sur la base du mode et de la voie d'administration et de pratiques pharmaceutiques standards. Des diluants et des supports acceptables d'un point de vue pharmaceutique ainsi que tout ce qui est nécessaire à leur usage dans des formulations pharmaceutiques sont décrits dans Remington's Pharmaceutical Sciences, un texte de référence standard dans ce domaine et dans le USP/NP.

De manière plus détaillée, on propose à titre d'exemple, d'administrer une protéine ou un polypeptide selon l'invention par voie orale. A cet effet, une protéine ou un polypeptide selon l'invention peut être encapsulée seule ou en présence d'autres protéines de *H. pylori* dans des capsules de gélatine afin de protéger l'antigène contre la dégradation par le suc gastrique ou bien administré en présence de bicarbonate de sodium. De telles formulations ont déjà été utilisées pour des compositions pharmaceutiques (Black et al, Dev. Biol. Stand. (1983) 52 : 9). La protéine peut également être encapsulée dans des microsphères de PLGA (copolymères d'acide glycolique et acide lactique) selon le protocole décrit ailleurs (Eldridge et al, Curr. Top. Microbiol. Immuno. (1989) 146 : 59) la protéine peut également être incluse dans des liposomes préparés selon les méthodes conventionnelles largement décrites ("Liposomes : a practical approach, Ed. RRC New, D. Rickwood & B.D. Hames, 1990, Oxford University Press, ISBN 0-19-963077-1").

De manière alternative, une protéine ou un polypeptide selon l'invention peut être administré par voie parentérale. Pour ce faire, une protéine ou un polypeptide selon l'invention est adsorbé sur gel d'alumine de façon tout à fait conventionnelle. La protéine en solution à 1 mg/ml dans un tampon dont le pH est voisin de 6,5 est mise en contact pendant 1 heure avec de l'hydroxyde d'aluminium à 10 mg/ml mesuré à AL<sup>++</sup>. La composition finale de la préparation est la suivante : protéine 50 µg/ml, AL<sup>++</sup> 250 µg/ml, méthiolate 1/10 000, le tout en PBS. Comme dans le cas de l'administration orale, 3 injections sont préconisées chacune espacée de 4 semaines de la précédente.

- 10 Un polypeptide selon l'invention peut être aussi utile en tant que réactif de diagnostic, par exemple pour détecter la présence d'anticorps anti-Helicobacter dans un échantillon biologique e.g. un échantillon de sang. A cette fin, un tel polypeptide comprend de manière avantageuse 5 à 80 acides aminés, de préférence 10 à 50 acides aminés. Un réactif polypeptidique selon l'invention peut être marqué ou pas, selon la méthode de diagnostic mise en œuvre. Des méthodes de diagnostic sont décrites plus avant dans le texte.
- 15

Selon un autre aspect, l'invention fournit un anticorps monospécifique capable de reconnaître une protéine ou un polypeptide selon l'invention.

- 20 Par "anticorps monospécifique" on entend un anticorps capable de réagir majoritairement avec une seule protéine d'*Helicobacter*. Un tel anticorps ne peut être obtenu qu'en utilisant une protéine实质lement purifiée, comme immunogène. Un anticorps selon l'invention peut être polyclonal ou monoclonal ; les monoclonaux peuvent être chimaériques (par exemple, constitués par une région variable d'origine murine associée à une région constante humaine) ou humannisée (seules les régions hypervariables sont d'origine animale, par exemple d'origine murine) et/ou par une chaîne simple. Les polyclonaux comme les monoclonaux peuvent aussi être sous forme de fragments d'immunoglobulines, par exemple un fragment F(ab)<sup>2</sup> ou Fab. Un anticorps selon l'invention peut aussi être de n'importe quel isotype par exemple IgG ou IgA ; un polyclonal peut être d'un isotype unique ou un mélange de tous ou partie d'entre eux.
- 25

Dans la suite du texte, les termes "anticorps monospécifique" et "antisérum monospécifique" seront employés de manière indifférente.

- 30 35 Un anticorps qui est dirigé à l'encontre d'une protéine selon l'invention, peut être produit et par la suite identifié en utilisant un dosage immunologique standard par exemple

analyse par Western blot, dot blot ou ELISA (voir par exemple Coligan et al. Current Protocols in Immunology (1994) John Wiley & sons Inc., New York, NY) ; Antibodies : A laboratory Manual, D. Lane, (1988) Harlow Ed.).

- 5 Un anticorps selon l'invention peut être utile en diagnostic, ainsi qu'en chromatographie d'affinité pour purifier à grande échelle, une protéine ou un polypeptide selon l'invention ; un tel anticorps est aussi potentiellement utile en tant qu'agent thérapeutique dans une procédure d'immunisation passive.
- 10 En conséquence, l'invention fournit également (i) un réactif pour détecter la présence d'*Helicobacter* dans un échantillon biologique, qui comprend un anticorps ou un polypeptide selon l'invention ; et (ii) une méthode de diagnostic pour détecter la présence d'*Helicobacter* dans un échantillon biologique, selon laquelle on met en contact l'échantillon biologique avec un anticorps ou un polypeptide selon l'invention, afin que se forme un complexe immun : de façon optionnelle, on élimine le matériel non lié, et on détecte le complexe immun formé entre l'échantillon et l'anticorps ou le polypeptide selon l'invention, en tant qu'indicateur de la présence d'*Helicobacter* dans l'échantillon ou dans l'organe dans lequel l'échantillon a été prélevé.
- 15

- 20 Comme on peut aisément le comprendre, un anticorps selon l'invention permet de tester la présence d'*Helicobacter* dans un extrait gastrique.

Pour l'utilisation dans un test diagnostic, le réactif pour être présenté sous forme libre ou immobilisé sur support solide ; ce dernier peut être n'importe quel support utilisé couramment dans ce domaine, par exemple, un tube, une bille ou un puits. L'immobilisation peut être obtenue par des moyens directs ou indirects. Les moyens directs comprennent l'adsorption passive (liaison non covalente) ou des liens covalents entre le support et le réactif. Par "moyen indirect" on signifie qu'un composé anti-réactif capable d'interagir un réactif, est tout d'abord attaché à un support solide. Par exemple, si on utilise un réactif polypeptidique, un anticorps capable de le lier peut être utilisé comme anti-réactif, à condition qu'il puisse se lier à un épitope du polypeptide qui n'est pas impliqué dans la reconnaissance des anticorps présents dans les échantillons biologiques. Les moyens indirects peuvent aussi être mis en œuvre par l'intermédiaire d'un système ligand-récepteur, par exemple en greffant une molécule, telle qu'une vitamine, sur un réactif polypeptidique et en immobilisant alors sous forme solide le récepteur correspondant. Ceci est illustré e.g. par le système biotine-streptavidine. De manière alternative, on utilise des

moyens indirects par exemple en ajoutant une queue peptidique au réactif e.g. par des moyens chimiques, et en immobilisant le produit greffé par adsorption passive ou par liaison covalente de la queue peptidique.

- 5 L'invention concerne également un procédé de purification d'une protéine ou d'un polypeptide selon l'invention à partir d'un échantillon biologique, selon lequel on soumet l'échantillon biologique à une chromatographie d'affinité mettant en œuvre un anticorps monospécifique selon l'invention.
- 10 A cette fin, l'anticorps peut être polyclonal ou monoclonal, de préférence de type IgG. Des IgGs purifiées peuvent être préparées à partir d'un antisérum selon les méthodes couramment pratiquées (voir par exemple Coligan et al).
- 15 Les supports de chromatographie conventionnels de même que des méthodes standard de greffe des anticorps sont décrites par exemple dans : Antibodies : A Laboratory Manual, D. Lane, Harlow Ed. (1988).
- En bref, un échantillon biologique, de préférence dans une solution tampon, est appliqué à un matériel de chromatographie, de préférence équilibré avec le tampon utilisé pour la dilution de l'échantillon biologique afin que la protéine ou le polypeptide selon l'invention (antigène) puisse être adsorbé sur le matériel. Le matériel de chromatographie, tel qu'un gel ou une résine associé à un anticorps selon l'invention, peut se présenter sous la forme d'un bain ou d'une colonne. Les composants qui restent non-liés sont éliminés par lavage et l'antigène est alors étudié dans un tampon d'élution approprié, comme par exemple, 20 un tampon de glycine ou un tampon contenant un agent chaotropique e.g. la guanidine HCl, ou une concentration riche en sel (par exemple, MgCl<sub>2</sub>, 3M). Les fractions eluées sont récupérées et la présence de l'antigène est alors mise en évidence par exemple en mesurant l'absorbance à 280 nm.
- 25 30 Un tel procédé de purification peut être par exemple mis en œuvre pour purifier une protéine à partir d'un extrait total. Néanmoins, si l'anticorps n'est pas parfaitement monospécifique, il convient au préalable d'enrichir le matériel destiné à être soumis à la chromatographie d'immunoaffinité, en quantité de protéine à purifier. Par exemple, un tel procédé peut être mis en œuvre pour parfaire la purification de la protéine de 32 kDa telle que obtenue selon le procédé décrit ci-dessus comportant une étape de purification sur SP-Sépharose.
- 35

- L'utilité thérapeutique ou prophylactique d'un anticorps selon l'invention peut être mise en évidence selon le test de protection de Lee et al. proposé ci-dessous pour les protéines ou polypeptides selon l'invention. Ainsi, l'invention a également pour objet (i) une composition de matière comprenant un anticorps monospécifique selon l'invention, et un diluant ou un support ; en particulier, (ii) une composition pharmaceutique comprenant un anticorps monospécifique selon l'invention en quantité efficace d'un point de vue thérapeutique ou prophylactique ; (iii) l'utilisation d'un anticorps monospécifique selon l'invention dans la préparation d'un médicament pour traiter ou prévenir une infection à *Helicobacter* ; ainsi que (iv) une méthode pour traiter ou prévenir une infection à *Helicobacter* (par exemple, *H. pylori*, *H. felis*, *H. mustelae* ou *H. heilmanni*), selon laquelle on administre une quantité thérapeutiquement ou prophylactiquement efficace d'un anticorps selon l'invention, à un individu ayant besoin d'un tel traitement.
- 15 A cette fin, l'anticorps monospécifique peut être polyclonal ou monoclonal, de préférence d'isotype IgA (d'une manière prédominante). Dans le cadre d'une méthode d'immunisation passive, l'anticorps est administré par voie mucosale à un mammifère, par exemple au niveau de la muqueuse gastrique, soit par voie orale ou intragastrique, aventureusement en présence d'un tampon bicarbonate. Un anticorps monospécifique selon 20 l'invention peut être administré en tant que seul composant actif ou en mélange comprenant au moins un anticorps monospécifique particulier à chaque polypeptide d'*Helicobacter*. La dose d'anticorps qui doit être utilisée dans cette méthode peut être aisément déterminée par l'homme du métier. Par exemple, on indique qu'une posologie peut être caractérisée par une administration journalière comprise entre 100 et 1 000 mg d'anticorps pendant une semaine 25 ; ou une dose comprenant 100 à 1 000 mg d'anticorps administrée trois fois par jour pendant deux à trois jours.

Une composition pharmaceutique comprenant un anticorps selon l'invention peut être fabriquée selon les règles énoncées ci-dessous pour une composition comprenant une protéine 30 ou un polypeptide selon l'invention. De même, s'appliquent des indications médicales identiques.

L'invention est illustrée ci-après par référence aux figures suivantes :

- 35 La Figure 1 est un schéma récapitulatif du protocole de préparation des fractions membranaires I, II et III d'*H. pylori*.

La Figure 2 présente l'analyse des fractions membranaires I, II et III par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% et coloration au bleu de Coomassie. Les échantillons déposés sont : la fraction membranaire I (colonne 2), la fraction membranaire II (colonne 3), la fraction membranaire III (colonne 4) et les marqueurs de poids moléculaire (colonne 1).

La Figure 3 présente l'analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% et coloration au bleu de Coomassie, des protéines purifiées à partir d'un gel préparatif (colonnes 3 à 7). Les échantillons déposés sont : la fraction HpP1 (colonne 3), la fraction HpP2 (colonne 4), la fraction HpP4 (colonne 5), la fraction HpP5 (colonne 6), la fraction HpP6 (colonne 7), les marqueurs de poids moléculaire (colonnes 1 et 8) et la fraction membranaire I (colonne 2).

La Figure 4 présente l'analyse des fractions issues du passage sur DEAE Sépharose, des fractions 7 et 9 (obtenues après elution sur Q Sépharose). Les fractions ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% ou 12.5% et colorées au bleu de Coomassie. Les échantillons déposés sont : la fraction 7 (colonne 2A), la fraction 7.1 (colonne 3A), la fraction 7.2 (colonne 4A), la fraction 9 (colonne 2B), la fraction 9.1 (colonne 3B), la fraction 9.2 (colonne 4B), la fraction 9.3 (colonne 5B) et les marqueurs de poids moléculaire (kDa) (colonnes 1A et 1B).

La Figure 5 présente, après électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% et coloration au bleu de Coomassie, le profil électrophorétique de la fraction D issue de la chromatographie sur colonne de Q-Sépharose de la fraction membranaire III (colonne 3) et de la fraction D' issue de la chromatographie sur colonne de S-Sépharose de la fraction D (colonne 4). La colonne 1 correspond aux marqueurs de poids moléculaire et la colonne 2, à la fraction membranaire III.

#### EXEMPLE 1 : Préparation des fractions membranaires

##### 1A - Culture

La souche *H. pylori* ATCC 43579 est cultivée en milieu liquide dans un fermenteur de 10 l.

Un congelat de germes en glycérrol est utilisé pour ensemencer un flacon de 75 cm<sup>2</sup> contenant du milieu dit "biphase" (une phase solide en gélose Colombia contenant 6 % de sang de mouton frais et une phase liquide en trypticase de soja contenant 20 % de sérum de veau foetal). Après 24 heures de culture dans des conditions microaérophiles, la phase liquide de cette culture est utilisée pour ensemencer plusieurs flacons de 75 cm<sup>2</sup> en milieu biphase en l'absence de sang de mouton. Après 24 heures de culture, la phase liquide permet d'ensemencer un bioréacteur de 2 l en milieu liquide trypticase soja contenant de la bêta cyclodextrine à 10 g/l. Cette culture à DO 1.5-1.8 est inoculée dans un fermenteur de 10 l en milieu liquide. Après 24 heures de culture, les bactéries sont récoltées par centrifugation à 4000 x g pendant 30 minutes à 4°C. Une culture de 10 litres de *H. pylori* ATCC 43579 en fermenteur permet d'obtenir environ 20 à 30 g (poids humide) de bactéries.

##### 1B - Extraction par le n octyl β-D glucopyranoside (OG)

Le culot de germes obtenu précédemment est lavé avec 500 ml de PBS (Phosphate buffer saline ; NaCl 7.650 g, phosphate di sodique 0.724 g phosphate monopotassique 0.210 g pour un litre ; pH 7.2) par litre de culture. Puis les germes sont à nouveau centrifugés dans les mêmes conditions.

Le culot bactérien obtenu (C<sub>1</sub>) est remis en suspension dans une solution d'OG (Sigma) à 1 % (30 ml/litre de culture). La suspension bactérienne est incubée pendant 1 heure à température ambiante sous agitation magnétique, puis centrifugée à 17 600 x g pendant 30 minutes à 4°C.

Le culot (C<sub>2</sub>) est conservé pour être traité par la suite.

Le surageant ( $S_2$ ) obtenu est dialysé (MWCO=10 000 Da. Spectra/por) pendant une nuit à 4°C sous agitation magnétique contre 2 fois 1 litre de PBS dilué au 1/2. Le précipité formé au cours de la dialyse est récupéré par centrifugation à 2 600 x g pendant 30 minutes à 4°C. Le surageant ( $S_{2d}$ ) est éliminé et le culot ( $C_{S2d}$ ) qui contient des protéines de membrane est conservé à -20°C.

#### 1C - Cassage des germes

Le culot ( $C_2$ ) obtenu après centrifugation des germes traités par l'OG est remis en suspension dans du tampon Tris-HCl 20 mM pH 7.5 et Pefabloc 100  $\mu$ M (tampon A) puis homogénéisé à l'aide de l'ultra-turax (3821, Janke & Kunkel). L'homogénat obtenu est mis en présence de lysozyme (0.1 mg/ml final) et d'EDTA (1 mM final).

L'homogénat est soniqué 3 fois 2 minutes à 4°C ( $\phi$  sonde=0.5 cm, puissance=20%, Sonifier 450 Branson), puis ultracentrifugé à 210 000 x g pendant 30 minutes à 4°C. Le surageant ( $S_3$ ) qui contient des protéines cytoplasmiques et périplasmiques, est éliminé, alors que le culot ( $C_3$ ) est récupéré, lavé en tampon A, puis ultracentrifugé à 210 000 x g pendant 30 minutes à 4°C. Après élimination du surageant ( $S_4$ ), le culot ( $C_4$ ) est conservé à -20°C. Ce culot contient des protéines membranaires intrinsèques et périphériques.

La procédure peut être poursuivie par un double lavage du culot  $C_4$  pour éliminer les protéines membranaires périphériques. Le culot  $C_4$  est remis en suspension dans du tampon NaCO<sub>3</sub> 50 mM pH 9.5, Pefabloc et 100  $\mu$ M (tampon B). La suspension est ultracentrifugée à 210 000 x g pendant 30 minutes à 4°C. Le surageant ( $S_5$ ) est éliminé puis le culot ( $C_5$ ) est lavé et ultracentrifugé dans les mêmes conditions que précédemment. Après élimination du surageant ( $S_6$ ), le culot ( $C_6$ ) qui contient essentiellement des protéines membranaires intrinsèques, est conservé à -20°C.

Les fractions  $C_4$ ,  $C_6$  et  $C_{S2d}$  sont appelées par la suite respectivement fractions membranaires I, II et III.

#### 1D - Analyse des fractions membranaires

35

Les différentes fractions membranaires sont analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS selon la méthode de Laemmli (1970). Les protéines sont visualisées après coloration au bleu de Coomassie.

Si on considère les protéines majeures de chaque fraction, les profils SDS-PAGE (Figure 2) montrent que la fraction membranaire I est très proche de la fraction membranaire II. Par contre ces deux dernières diffèrent sensiblement de la fraction membranaire III.

Le profil de la fraction membranaire I présente 7 bandes protéiques majeures de poids moléculaires respectifs 87, 76, 67, 54, 50, 47 et 32-35 kDa (colonne 2). Par western blot en présence d'anticorps anti-ureB ou d'anticorps anti-cavalase, on a montré que la bande à 67 kDa correspondait à la sous-unité B de l'uréase et la bande à 54 kDa correspondait à la cavalase. Ces deux protéines ne se retrouvent pas dans le profil de la fraction II (colonne 3) puisque le lavage en tampon carbonate élimine les protéines faiblement associées à la membrane. Quant au profil protéique de la fraction membranaire III, il montre la présence de 4 bandes majeures à 76, 67, 50 et 30 kDa (colonne 4).

#### 20 EXEMPLE 2 : Purification des protéines de la fraction membranaire I par SDS-PAGE préparative

Une électrophorèse est réalisée sur gel de polyacrylamide selon la méthode de Laemmli (1970) avec un gel de concentration de 5% et un gel de séparation de 10%. La fraction membranaire est remise en suspension dans le tampon A, puis diluée au demi dans le tampon échantillon 2X. Le mélange est chauffé 5 minutes à 95°C. Environ 19 mg de protéines sont déposés sur un gel de dimension 16 x 12 cm et d'épaisseur 5 mm. Une préminération est effectuée à 50 V pendant 2 heures, suivie d'une migration à 65 V pendant la nuit. La coloration du gel au bleu de Coomassie R250 (0.05% dans l'eau ultrafiltrée) permet une bonne visualisation des bandes.

Les bandes majeures HpP1, HpP2, HpP4, HpP5 et HpP6 sont découpées au scalpel et broyées à l'ultra-turax en présence de 10 ou 20 ml de tampon d'extraction Tris-HCl 25 mM pH 8.3, ure 8 M, SDS 10%, phénol méthyl sulfonyl fluorique (PMSF) 100  $\mu$ M et Pefabloc 100  $\mu$ M (tampon C). Chaque broyat est filtré sur un préfiltre Millipore AP20 ( $\phi$  filtre = 4.7 cm,  $\phi$  pore = 20  $\mu$ m) à l'aide d'un extrudeur à une pression de 7 bars à température

ambiente. Chaque broyat est lavé avec 5 à 10 ml de tampon C et filtré comme précédemment. Les deux filtrats obtenus à partir de chaque broyat correspondant sont rassemblés.

5 Chaque filtre est précipité avec 3 volumes d'un mélange 50 : 50 méthanol 75% et isopropanol 75%, puis ultracentrifugé à 240 000 x g pendant 16 heures à 10°C sur rotor 70 TFT (J8-55, Beckman).

Chaque culot est repris par 2 ml de tampon de solubilisation NaPO<sub>4</sub> 10 mM pH 7,0.  
10 NaCl 1 M, Sarkosyl 0,1%, PMSF 100 μM, Pefabloc 100 μM et urée 6 M (tampon D). L'échantillon solubilisé est dialysé successivement contre 100 ml de tampon D à 4 M d'urée et 0,1% de Sarkosyl, contre 100 ml de tampon D à 2 M d'urée et 0,5% de Sarkosyl et contre 2 fois 100 ml de tampon D sans urée et à 0,5% de Sarkosyl. La dialyse est effectuée pendant 1 heure sous agitation magnétique à température ambiante. Le dialysat final est incubé pendant 30 minutes dans un bain de glace, puis centrifugé à faible vitesse pendant 10 minutes à 4°C (Biofuge A, Heraeus Sepatech). Le surnageant est récupéré, filtré sur filtre Millipore à 0,45 μm et conservé à -20°C.

Une analyse SDS-PAGE a été réalisée pour chaque fraction (Figure 3).

20 L'analyse du profil électrophorétique de chaque fraction montre que les fractions HpP1, HpP2 et HpP4 sont pures avec une seule bande sur gel pour chacune de ces fractions (respectivement à 87, 76 et 54 kDa). La fraction HpP5 présente une bande de forte intensité à 50 kDa légèrement contaminée par une bande à 47 kDa ; de même la fraction HpP6 présente une bande de forte intensité à 32 kDa légèrement contaminée par une bande à 35 kDa.

**EXEMPLE 3 : Purification des protéines membranaires de 30, 50 et 54 kDa à partir de la fraction membranaire I**

30 **3A - Chromatographie échangeuse d'anions sur Q-Sépharose**

Une colonne de Q Sépharose de 40 ml ( $\phi=2.5$  cm,  $h=8$  cm) est préparée selon les indications du fabricant (Pharmacia). La colonne est lavée, puis équilibrée avec le tampon NaCO<sub>3</sub> 50 mM pH 9,5, Pefabloc 100 μM et Zwittergent 3-14 à 0,1%. La chromatographie a été suivie par une détection UV à 280 nm à la sortie de la colonne.

Cent quarante mg de protéines de la fraction membranaire I préalablement solubilisées sont déposées sur la colonne qui est ensuite lavée avec le tampon d'équilibrage (NaCO<sub>3</sub> 50 mM pH 9,5, Pefabloc 100 μM et Zwittergent 3-14 0,1%)

5 jusqu'à ce que l'absorbance à 280 nm soit stabilisée. Les protéines sont élues par un gradient de 0,1 à 0,5 M de NaCl dans le tampon d'équilibre (10 fois V<sub>T</sub>), suivi d'un lavage en tampon d'équilibrage contenant 0,5 et 1 M de NaCl (2 fois V<sub>T</sub>). Les fractions collectées sont analysées par SDS-PAGE et rassemblées en différents pools selon leur profil électrophorétique, puis conservées à -20°C. Les fractions sont comme suit :

fractions	état	fractions	état
1	début direct	6	NaCl 0,25-0,28M
2	lavage tampon équilibre	7	NaCl 0,28-0,35M
3	NaCl 0-0,1M	8	NaCl 0,35-0,5M
4	NaCl 0,1-0,2M	9	début lavage NaCl 1M
5	NaCl 0,2-0,25M	10	fin lavage NaCl 1M

Le bilan protéique montre que 53% des protéines sont élues au cours du

gradient de NaCl 0-0,5 M, 14% des protéines ne se sont pas fixées sur la colonne et 31% des protéines sont étudiées au cours du lavage en NaCl 1 M (tableau 5). Les protéines non fixées sur la colonne, correspondent à des protéines alcalines chargées positivement à pH 7,5, alors que les protéines élues en 1 M NaCl correspondent à des protéines acides fortement chargées à ce pH.

20 La purification des fractions 7 et 9 est poursuivie comme suit.

3B - Séparation des protéines des fractions 7 et 9 par chromatographie échangeuse d'anions sur DEAE Sépharose

25 Une colonne de DEAE Sépharose est préparée selon les indications du fabricant (Pharmacia) pour un volume de gel d'environ 10 ml ( $\phi=1,5$  cm,  $h=5$  cm) (maximal 10 mg protéine/ml de gel). La colonne est lavée, puis équilibrée avec le tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,5, Pefabloc 100 μM et Zwittergent 3-14 à 0,1%. La chromatographie est suivie comme précédemment par une détection UV à 280nm à la sortie de la colonne.

30

La fraction 7 dialysée au préalable contre le tampon d'équilibrage (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, Pefabloc 100 µM et Zwittergent 3-14 0.1%) contenant 10 mg de protéines, est déposée sur la colonne de DEAE Sépharose. La colonne est lavée en tampon d'équilibrage jusqu'à ce que l'absorbance à 280 nm soit stabilisée. Les protéines sont élues par un gradient de 0 à 0.5 M de NaCl dans le tampon d'équilibrage (10 fois  $V_T$ ), suivi d'un lavage en tampon d'équilibrage contenant 1 M de NaCl (2 fois  $x V_T$ ). Les fractions collectées sont analysées par SDS-PAGE, puis rassemblées en différents pools selon leur profil protéique et conservées à -20°C. Par SDS-PAGE, on montre que la fraction 7.1 (élut direct) est d'intérêt.

Une purification identique est reconduite avec la fraction 9 contenant 31 mg de protéines. Par SDS-PAGE on montre que les fractions 9.1, 9.2 et 9.3 respectivement élues à 0.1 - 0.25 M NaCl, 0.3 - 0.4 M NaCl et 1 M NaCl sont d'intérêt.

Pour la fraction 7 (Figure 4A), les résultats obtenus montrent que seulement une protéine de 30 kDa (colonne 3 ; fraction 7.1) a été enrichie et partiellement séparée après passage sur la colonne de DEAE Sépharose, les autres protéines n'ont pas été séparées. Pour la fraction 9 (Figure 4B), les profils électrophorétiques montrent que deux protéines de 54 et 15 kDa (colonnes 3 et 5 ; fractions 9.1 et 9.3) ont été séparées et une protéine de 50 kDa a été enrichie (colonne 4 ; fraction 9.2). La protéine de 54 kDa de la fraction 9.1 ne réagit pas avec des anticorps anti-catalase.

**EXEMPLE 4 : Purification de la protéine membranaire de 32 kDa à partir de la fraction membranaire I**

La fraction membranaire I est solubilisée en tampon NaCO<sub>3</sub> 50 mM pH 9.5 à température ambiante pendant 30 min sous agitation. La suspension est ensuite centrifugé à 200 000 xg pendant 30 min à +4°C. Le surnageant est dialysé contre du tampon NaPO<sub>4</sub> 50 mM pH 7.0 puis déposé sur une colonne de SP-Sépharose préalablement équilibré avec ce même tampon. Après lavage de la colonne avec ce même tampon, la colonne est soumise à un gradient de NaCl 0-0.5 M. La fraction élue entre 0.26 et 0.31 M contient la protéine de 32 kDa.

35

**EXEMPLE 5 : Préparation de sérums hyperimmuns à l'encontre des fractions HpPS et HpP6.**

Des sérums polyclonaux spécifiques des protéines membranaires majeures *H. pylori* sont obtenus par hyperimmunisation des lapins respectivement avec les antigènes purifiés par SDS-PAGE préparative HpPS et HpP6. La première injection J0 (sous-cutanée multisites et intramusculaire) est effectuée avec une préparation contenant 50 µg de protéine membranaire émulsionnée en adjuvant complet de Freund, puis les rappels J21 et J42 se font par injection de 25 µg de protéine membranaire en adjuvant incomplet de Freund. Les animaux sont sacrifiés à J60. Les sérums obtenus sont complémentés pendant 30 minutes à 56°C et stérilisés par filtration sur membrane de porosité 0.22 µm (Millipore).

L'anticorps anti-HpPS réagit avec la protéine de 50 kDa isolée dans la fraction 9.2 obtenue dans l'Exemple 3. L'anticorps anti-HpP6 réagit avec la protéine de 32 kDa isolée dans la fraction élue entre 0.26 - 0.31 M NaCl sur SP-Sépharose, telle qu'obtenue dans l'Exemple 4.

Bien évidemment, le protocole d'immunisation décrit ci-avant peut être utilisé de manière similaire pour produire des anticorps à l'encontre de chacune des protéines purifiées à l'Exemple 3. Les préparations obtenues dans ces exemples pourront être avantageusement soumises à une électrophorèse préparative sur gel de SDS-PAGE. Les bandes protéiques seront traitées comme précédemment afin d'obtenir une préparation destinée à l'immunisation.

**EXEMPLE 6 : Purification d'une catalase à partir d'*H. pylori***

Une culture est réalisée comme décrit dans l'Exemple 1A. Le culot bactérien lavé est remis en suspension dans du tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7.5 contenant du PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride Sigma) 100 µM (tampon A) à concentration finale de 0.1 g (poids humide) par millilitre. La suspension est homogénéisée à l'aide d'un mixeur de type Ultraturrax. Les cellules bactériennes sont ensuite cassées par sonication avec un appareil de type Sonifier (Branson) équipé d'une sonde de diamètre 1.8 cm. La sonication s'effectue par intermittence, 1 min de sonication et 1 min de repos sur glace. Une sonication de 10 min est suffisante pour casser complètement 5 g de germes en suspension. Le lysat ainsi obtenu est centrifugé pendant 15 min à 4°C à 4 000 g. Le surnageant est

récupéré puis, centrifugé à nouveau à 100 000 g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant de cette deuxième centrifugation (S2) est récupéré pour une purification chromatographique. La fraction S2 préparée de cette façon conserve environ 90% de l'activité enzymatique "catalase" totale, telle que mesurée selon la technique de Hazell et al (*supra*) ou Beers & Sizer, J. Biol. Chem. (1952) 125 : 133.

La fraction S2 est chargée sur une colonne S-Sépharose (Pharmacia) préalablement équilibrée avec du tampon A. La colonne est lavée avec le même tampon. La chromatographie est suivie avec un détecteur UV à 280 nm pour les protéines et par l'activité enzymatique pour la catalase. Après élimination des protéines non-fixées (l'absorption à 280 nm revient à la ligne de base), la colonne est ensuite lavée avec un gradient de NaCl, 0 à 1M dans le tampon A. Les fractions correspondant au pic de l'activité catalase sont recueillies, concentrées dans une cellule de concentration de type Amicon équipée de membrane dont le seuil de coupure est de 100 000 Daltons. La fraction concentrée ainsi obtenue est chargé sur une colonne Séphacryl S-300 HR préalablement équilibrée avec du tampon PBS. Les fractions contenant de l'activité catalase sont recueillies, concentrées à 1 mg/ml et dialysées contre le tampon PBS. La solution finale est filtrée sur une membrane de porosité 0,22 µm et conservée à -70°C.

La protéine ainsi purifiée présente les caractéristiques suivantes:

- (i) Une activité enzymatique de catalase typique, en l'absence d'activité peroxydase.
- (ii) Un spectre visible typique d'une hémoprotéine, un pic de Soret à 406 nm et les pics d'alpha et de bêta entre 520 nm et 550 nm.
- (iii) Une forme monomérique à 54 kDa en SDS-PAGE avec la séquence N-terminale suivante: MVNKDVVKQTTAFGAPVWDDNVITAGPRG.

#### EXEMPLE 7 Purification de la protéine membranaire de 50 kDa par immunoaffinité

##### 7.A - Purification des IgGs

Un sérum hyperimmun anti-fraction HpPS tel que préparé dans l'Exemple 5, est déposé sur une colonne Protéine A Sépharose 4 Fast Flow (Pharmacia) préalablement équilibrée en Tris-HCl 100 mM pH 8.0. La résine est lavée par 10 volumes de colonne de Tris-HCl 100 mM pH 8.0 puis par 10 volumes de colonne de Tris-HCl 10 mM pH 8.0. Les IgGs sont eluées en tampon glycine 0.1 M pH 3.0. Les IgGs sont collectées en tant que fractions de 5 ml auxquelles est ajouté 0.25 ml de Tris-HCl 1 M pH 8.0. La densité optique de l'éluat est mesurée à 280 nm et les fractions contenant les IgGs sont rassemblées et si nécessaire, congelées à -70°C.

##### 7.B - Préparation de la colonne

Une quantité appropriée de gel CNBr-activated Sépharose 4B (sachant que 1 g de gel sec donne environ 3.5 ml de gel hydraté et que la capacité du gel est 5 à 10 mg d'IgG par ml de gel) fabriqué par Pharmacia (ref : 17-0430-01) est mis en suspension dans du tampon NaCl 1 mM. Le gel est ensuite lavé à l'aide d'un buchner en ajoutant de petites quantités d'HCl 1 mM. Le volume total d'HCl 1 mM utilisé est de 200 ml par gramme de gel.

Les IgGs purifiées sont dialysées pendant 4 hrs à 20 + 5°C contre 50 vol. de tampon phosphate de sodium 500 mM pH 7.5. Elles sont ensuite diluées en tampon phosphate de sodium 500 mM pH 7.5 à une concentration finale de 3 mg/ml.

Les IgGs sont incubées avec le gel pendant une nuit à 5 + 3 °C sous agitation rotative. Le gel est mis dans une colonne de chromatographie et lavé avec 2 vol. de colonne de tampon phosphate 500 mM pH 7.5. Le gel est alors transféré dans un tube et incubé en éthanalamine 100 mM pH 7.5 à la température ambiante sous agitation. Il est ensuite lavé par 2 vol. de colonne de PBS. Le gel peut être conservé en PBS mercuriale 1/10 000. La quantité d'IgGs couplées au gel peut être déterminé en mesurant la différence de densité optique à 280 nm de la solution initiale d'IgGs et de l'éluat direct plus les lavages.

**7.C - Adsorption et élution de l'antigène**

Une préparation protéique d'antigène en Tris-HCl 50 mM pH 8.0 EDTA 2 mM, par exemple la fraction membranaire I ou II (fraction C4 ou C6 telles qu'obtenue dans l'Exemple 1C et solubilisée en zwittergent) est filtrée au travers d'une membrane de 0,45 µm puis est déposée sur la colonne équilibrée au préalable avec du Tris-HCl 50 mM pH 8.0 EDTA 2 mM, à un débit d'environ 10 ml/hr. Ensuite, la colonne est lavée par 20 vol. de Tris-HCl 50 mM pH 8.0 EDTA 2 mM, de manière alternative, l'adsorption peut être mise en œuvre en bain : l'incubation est poursuivie à 5 + 3°C pendant la nuit et sous agitation.

Le gel est lavé par 2 à 6 vol. de tampon phosphate de sodium 10 mM, pH 6.8. L'antigène est élut avec du tampon glycine 100 mM pH 2.5. L'éluat est récolté dans des fractions de 3 ml auxquelles sont ajoutés 150 µl de tampon phosphate de sodium 1 M, pH 8.0. La densité optique de chaque fraction est mesurée à 280 nm; les fractions contenant l'antigène sont rassemblées et conservées à -70°C. L'analyse par électrophorèse sur gel de SDS-PAGE 10 % révèle une seule bande à 50 kDa.

**20 EXEMPLE 8 Purification de la protéine membranaire de 32 kDa par immunoadsorbance**

L'Exemple 7 est répété en utilisant l'antisérum anti-fraction HpP6, afin de poursuivre la purification de la fraction élue entre 0,26 et 0,31 M NaCl comme décrit dans l'Exemple 4. Les fractions collectées après dilution et contenant la protéine sont rassemblées en une seule préparation ; celle-ci est analysée par électrophorèse sur gel de SDS Page 10 %. Une seule bande apparaît à 32 kDa.

**EXEMPLE 9 Test d'agglutination**

**30 9.A - Culture**

A partir d'une souche d'*H. pylori* n° ATCC 43579® (disponible auprès de l'ATCC, 12301 Parklawn Drive, Rockville MD - USA) conservée en glycérol à -70 °C, on ensème un flacon de 25 cm<sup>2</sup> contenant un milieu biphasique. Le milieu biphasique comprend une phase solide constituée de 10 ml de gélose Colombia

(Biomérieux) additionnée de 6 % de sang de mouton frais et une phase liquide constituée de 3 ml de bouillon Tryptase soja (Difco) contenant 20 % de sérum de veau fœtal. Les flacons sont placés dans un sac étanche dit "generbag" (BBL) et incubés sous agitation rotative douce à 37°C pendant 48 heures en condition de microstérilie (8-10 % CO<sub>2</sub>, 5-7 % O<sub>2</sub> et 85-87 % N<sub>2</sub>) obtenu par le System Microfer (BBL).

Cette culture de 48 heures est utilisée pour ensemencer de nouveau des flacons contenant du milieu biphasique. L'absorbance initiale de cette culture à 600 nm doit être comprise entre 0,15 et 0,2. Les flacons sont incubés dans des conditions identiques à celles décrites précédemment.

Après 48 heures, la suspension bactérienne est transvasée dans un tube à essai. L'absorbance de cette culture est mesurée et elle doit se situer entre 3,0 et 3,5 à 600nm. L'aspect des germes est contrôlé sous microscope après une coloration au Gram.

**9.B - Antisérum**

Un antisérum tel qu'obtenu dans l'Exemple 5 est filtré sur une membrane 0,45 µm pour éliminer les petits agrégats s'il en existe avant utilisation.

**9.C - Test d'agglutination**

Sur une lame pour immunoprecipitation à fond noir (Prolabo réf. 10050), on dépose 20 µl d'eau physiologique dans le premier puit, 20 µl de sérum prélevé avant immunisation dans le puit central et 20 µl d'antisérum dans le troisième puits. Vingt µl de suspension bactérienne d'*H. pylori* sont ajoutés dans chacun des trois puits et on mélange ensuite les gouttes à l'aide d'une pipette Pasteur à bout rond fermé.

On observe sous une loupe miroir, l'apparition d'une agglutination 5 minutes maximum après avoir réalisé le mélange. L'agglutination est complète lorsque le mélange se présente sous la forme d'une solution limpide comprenant de gros agrégats. Les témoins négatifs, soit avec de l'eau physiologique, soit avec le sérum de pré-immunisation, doivent rester troubles, révélant que la suspension bactérienne est inacte.

Les antisérum anti-fraction HpP3 et anti-fraction HpP6 montrent une réaction d'agglutination très forte. Dans les conditions testées, les bactéries *D. pylori* s'agglutinent rapidement et la réaction est complète après une minute. Les résultats indiquent que les protéines de 50 et 32 kDa sont vraisemblablement exposées à la surface de *D. pylori*.

**EXEMPLE 10** Mise en évidence de l'effet protecteur des protéines membranaires de 54, 50, 30 et 32 kDa

Des groupes d'une dizaine de souris Swiss Webster Agées de 6 à 8 semaines (Taconic Labs, Germantown, NY), sont immunisés par voie intragastrique avec 1, 5, 25, 50 ou 100 µg de l'antigène de 54, 50 ou 30 kDa purifié par chromatographie tel que décrit à l'Exemple 3 ; ou de l'antigène de 32 kDa purifié par chromatographie tel que décrit à l'Exemple 4 ou 15 par immunosorbance tel que décrit dans l'Exemple 8 ; ou de l'antigène de 50 kDa purifié par immunosorbance tel que décrit dans l'Exemple 7 (préféré). L'antigène est dilué en PBS ou en PBS contenant 0,24 M de bicarbonate de sodium. L'antigène est supplémenté par 5 ou 10 µg de toxine cholérique (CT) (Calbiochem, San Diego) ou de heat-labile toxine (LT) (Bema Products, Coral Gables FL). Les souris sont tout d'abord anesthésiées avec de 20 l'isoflurane ; puis la dose est administrée sous un volume d'environ 0,5 ml à l'aide d'une canule. Quatre doses sont administrées à chaque souris à 7-10 jours d'intervalle. Deux semaines après la dernière administration d'antigène, les souris sont éprouvées par une dose unique de la souche *H. pylori* ORV2002 (1 x 10<sup>7</sup> de bactéries vivantes dans 200 µl de PBS : DO<sub>50</sub> de 0,5 environ) administrée par voie intragastrique. Un groupe n'ayant reçu aucune dose d'antigène et servant de contrôle est éprouvé de même. Deux semaines après l'épreuve, les souris sont sacrifiées. Le pourcentage de protection est déterminé soit en mesurant l'activité urease ou en évaluant la charge bactérienne par histologie ainsi que cela est décrit dans Lee et al (supra) ou directement par culture quantitative d'*H. pylori*. Dans ces conditions, on est en mesure d'observer pour chacune des protéines de 54, 50, 30 et 32 kDa, une réduction sensible de la charge infectieuse chez la plupart des souris immunisées avec 25 25 µg par rapport au groupe contrôle : ceci permet de conclure que les antigènes de 54, 50, 30 et 32 kDa d'*H. pylori* sont au moins partiellement protecteurs ; les meilleurs résultats étant obtenus avec la protéine de 32 kDa (100 % de protection).

## **LISTE DE SEQUENCES**

## (1) INFORMATIONS GÉNÉRALES

**(i) DEPOSANT:**  
(A) NOM: Pasteur Merieux serums et vaccins  
(B) RUE: 58 avenue Leclerc  
(C) VILLE: Lyon  
(E) PAYS: France  
(F) CODE POSTAL: 69007  
(G) TELEPHONE: 72 73 79 31  
(H) TELECOPIE: 72 73 79 50

15 (ii) TITRE DE L'INVENTION: Nouvelles protéines membranaires  
*d'Helicobacter pylori*

#### **(iii) NOMBRE DE SÉQUENCES:**

#### 20 (iv) FORME DECHIFFERABLE PAR ORDINATEUR

(A) TYPE DE SUPPORT: Tape  
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible  
(C) SYSTEME D'EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS  
(D) LOGICIEL: Patenti Release #1.0, Version #1.30 (OFFICE)

**(3) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1**

## (i) CARACTÉRISTIQUES DE LA SÉQUENCE:

(A) LONGUEUR: 22 acides aminés  
(B) TYPE: acide aminé  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

### 3.5 (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(iii) HYPOTHETIQUE: NON  
(iv) ANTI-SENS: NON

#### 4.2.4.2 DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1

Met Lys Glu Lys Phe Asn Arg Thr Lys Pro His Val Asn Ile Gly Thr  
1 5 10 15

45 Ile Gly His Val Asp His  
29

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

- 5           (i) CARACTÉRISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
              (A) LONGUEUR: 29 acides aminés  
              (B) TYPE: acide aminé  
              (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
              (D) CONFIGURATION: linéaire
- 10          (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine  
              (iii) HYPOTHÉTIQUE: NON  
              (iv) ANTI-SENS: NON  
              (v) TYPE DE FRAGMENT: N-terminal
- 15          (x) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:  
              Met Val Asn Lys Asp Val Lys Gln Thr Thr Ala Phe Gly Ala Pro Val  
              1                           5                           10                           15  
              20       Trp Asp Asp Asn Asn Val Ile Thr Ala Gly Pro Arg Gly  
    25

## Revendications

1. Une protéine d'*Helicobacter pylori* sous forme substantiellement purifiée, susceptible d'être obtenue à partir d'une fraction membranaire d'*H. pylori* et dont le poids moléculaire après électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10 % en présence de SDS, apparaît de l'ordre de 54, 50, 32-35 ou 30 kDa ; à condition que lorsque le poids moléculaire est de 54 kDa, la protéine ne réagisse pas avec un antisérum anti-catalase.
2. Une protéine selon la revendication 1, dont le poids moléculaire apparent est de l'ordre de 54 kDa et qui est susceptible d'être obtenue par un procédé dans lequel :
  - (i) on procède à une extraction des bactéries *H. pylori* par du n-octyl β-D glucopyranoside 1%, suivie d'une centrifugation ;
  - (ii) on récupère un culot bactérien que l'on traite par du lysozyme et que l'on soumet à sonication, suivie d'une centrifugation ;
  - (iii) on récupère un culot de centrifugation que l'on soumet à un lavage en tampon Tris HCl 20 mM pH 7.5, suivi d'une centrifugation ;
  - (iv) on récupère la fraction membranaire constituée du culot de centrifugation que l'on resuspend en milieu aqueux ;
  - (v) on soumet la fraction membranaire à une chromatographie échangeuse d'anions sur colonne Q-Sépharose en gradient de NaCl 0 - 0.5 M, suivi d'un lavage en NaCl 1 M ;
  - (vi) on récupère la fraction élue en début de lavage en NaCl 1 M que l'on soumet à une chromatographie échangeuse d'anions sur colonne de DEAE Sépharose en gradient de NaCl 0 - 0.5 M ; et
  - (vii) on récupère la fraction élue en NaCl 0.1 - 0.25 M.

3. Une protéine selon la revendication 1, dont le poids moléculaire apparent est de l'ordre de 50 kDa et qui est susceptible d'être obtenue par un procédé dans lequel :
  - (i) on procède à une extraction des bactéries *H. pylori* par du n-octyl β-D glucopyranoside 1%, suivie d'une centrifugation ;
  - (ii) on récupère un culot bactérien que l'on traite par du lysozyme et que l'on soumet à sonication, suivie d'une centrifugation ;
  - (iii) on récupère un culot de centrifugation que l'on soumet à un lavage en tampon Tris HCl 20 mM pH 7,5, suivi d'une centrifugation ;
  - (iv) on récupère la fraction membranaire constituée du culot de centrifugation que l'on resuspend en milieu aqueux ;
  - (v) on soumet la fraction membranaire à une chromatographie échangeuse d'anions sur colonne Q-Sépharose en gradient de NaCl 0 - 0,5 M, suivi d'un lavage en NaCl 1 M ;
  - (vi) on récupère la fraction élutée en début de lavage en NaCl 1 M que l'on soumet à une chromatographie échangeuse d'anions sur colonne de DEAE Sépharose en gradient de NaCl 0 - 0,5 M ; et
  - (vii) on récupère la fraction élutée en NaCl 0,3 - 0,4 M.
4. Une protéine selon la revendication 3, qui a pour séquence N-terminale la séquence d'acide aminés telle que montrée dans l'ID SEQ NO 1.
5. Une protéine selon la revendication 1, dont le poids moléculaire apparent est de l'ordre de 30 kDa et qui est susceptible d'être obtenue par un procédé dans lequel :
  - (i) on procède à une extraction des bactéries *H. pylori* par du n-octyl β-D glucopyranoside 1%, suivie d'une centrifugation ;

- (ii) on récupère un culot bactérien que l'on traite par du lysozyme et que l'on soumet à sonication, suivie d'une centrifugation ;
- (iii) on récupère un culot de centrifugation que l'on soumet à un lavage en tampon Tris HCl 20 mM pH 7,5, suivi d'une centrifugation ;
- (iv) on récupère la fraction membranaire constituée du culot de centrifugation que l'on resuspend en milieu aqueux ;
- (v) on soumet la fraction membranaire à une chromatographie échangeuse d'anions sur colonne de Q-Sépharose en gradient de NaCl 0 - 0,5 M ;
- (vi) on récupère la fraction élutée en NaCl 0,28 - 0,35 M, que l'on soumet à une chromatographie échangeuse d'anions sur colonne de DEAE Sépharose en gradient de NaCl 0 - 0,5 M ; et
- (vii) on récupère la fraction correspondant à l'éluat direct (absence de NaCl).
6. Une protéine selon la revendication 1, dont le poids moléculaire apparent est de l'ordre de 32-35 kDa et qui est susceptible d'être obtenue par un procédé dans lequel :
  - (i) on procède à une extraction des bactéries *H. pylori* par du n-octyl β-D glucopyranoside 1%, suivie d'une centrifugation ;
  - (ii) on récupère un culot bactérien que l'on traite par du lysozyme et que l'on soumet à sonication, suivie d'une centrifugation ;
  - (iii) on récupère un culot de centrifugation que l'on soumet à un lavage en tampon Tris HCl 20 mM pH 7,5, suivi d'une centrifugation ;
  - (iv) on récupère la fraction membranaire constituée du culot de centrifugation que l'on resuspend en milieu aqueux, avantagéusement en tampon carbonate pH 9,5 ;
  - (v) on centrifuge la suspension obtenue en (iv) à environ 200 000 xg et on récupère le surnageant ;

- (vi) on abaisse le pH du surnageant obtenu en (v) jusqu'à environ pH 7, avantageusement par dialyse contre un tampon phosphate pH 7 ;
- (vii) on soumet la préparation obtenue en (vi) à une chromatographie échangeuse de cations sur colonne de SP-Sépharose en gradient de NaCl 0 - 0,5 M, avantageusement dans un tampon phosphate pH 7 ; et
- (viii) on récupère la fraction eluée en NaCl 0,26 - 0,31 M.
7. Une protéine *d'Helicobacter* ou un polypeptide dérivé de la protéine par fragmentation et/ou mutation, sous forme substantiellement purifiée, qui est capable d'être reconnu par un antisérum établi à l'encontre d'une protéine selon l'une des revendications 1 à 6.
  8. Une composition pharmaceutique destinée à la prévention ou au traitement d'une infection à *H. pylori*, qui comprend à titre de principe actif une protéine ou un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 7.
  9. Un anticorps monospécifique capable de reconnaître une protéine ou un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 7.
  10. Une composition pharmaceutique destinée à la prévention ou au traitement d'une infection à *H. pylori*, qui comprend à titre de principe actif un anticorps monospécifique selon la revendication 9.
  11. Une méthode de diagnostic permettant de détecter la présence *d'Helicobacter* dans un échantillon biologique, selon laquelle on met en contact l'échantillon biologique avec un anticorps selon la revendication 9 ou un polypeptide selon la revendication 7, afin que se forme un complexe immun, on élimine de façon optionnelle, le matériel non lié, et on détecte le complexe immun formé entre l'échantillon et l'anticorps ou le polypeptide.
  12. Un procédé de purification d'une protéine ou d'un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 7, à partir d'un échantillon biologique, selon lequel on soumet l'échantillon biologique à une chromatographie d'affinité mettant en œuvre un anticorps monospécifique selon la revendication 9.

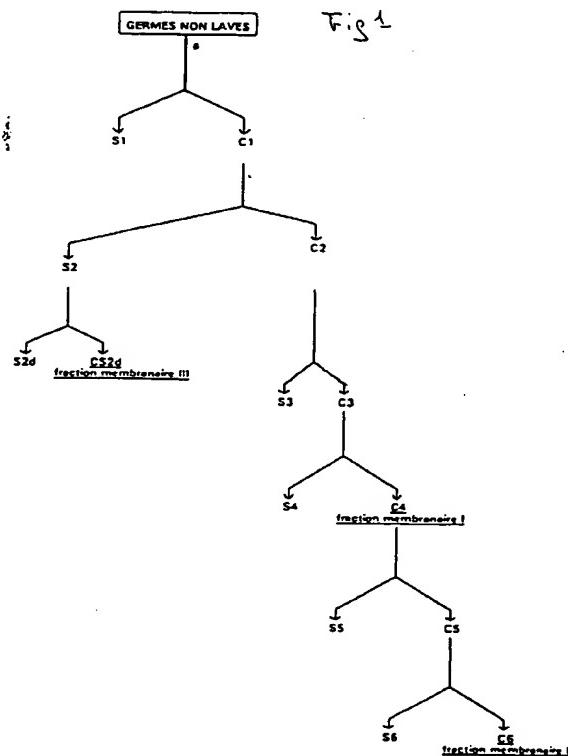


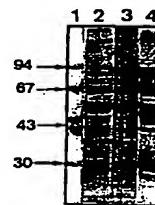
Figure 2Figure 3

Figure 4

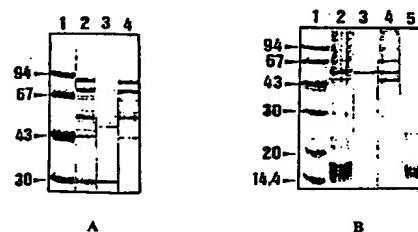
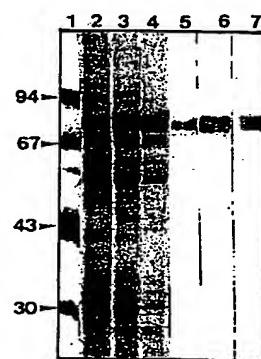


Figure 5



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Appl. No.  
PCT/FR 96/01552

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C07K14/205 A61K39/106 C07K16/12 A61K39/48 G01N33/569

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classifications and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

International classification system (Classification system followed by classification system)

IPC 6 C07K A61K

Documents searched other than documents characteristic to the extent that such documents are included in the fields searched

Characterized class has been designated during the international search (name of class from int. doc., where practical, search number and)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Character of document, with reference, where appropriate, of the relevant passage	Reference to claim No.
X	INFECTIO AND IMMUNITY, vol. 63, no. 4, April 1995, WASHINGTON US, pages 1567-1572, XP062093585 H.M. EXNER ET AL.: "ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A FAMILY OF PORIN PROTEINS FROM HELICOBACTER PYLORI." cited in the application see the whole document ---	1,3,7-9
A	FR-A-2 669 929 (QUIDEL CORPORATION) 5 June 1992 see the whole document ---	1-12 -/-

Further documents are listed on the continuation of this C.  Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- "A" document which is a general class of the art which is not specifically cited to be relevant to the application
- "B" document not published on or after the international filing date
- "C" document which may derive directly from another document or which is cited in the application as being of interest either for general reasons or for specific reasons
- "D" document concerning an invention or an improvement in or relating to an article, method, composition or process
- "E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "F" document member of the same patent family

Date of the earliest completion of the international search Date of mailing of the international search report

22 January 1997

05.02.97

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
Sint-Pieters Post Office, P.O. 3611 Parijsstraat 2 B-1200 Brussels, Belgium Tel. (+ 32-70) 346-2000, Te. 31 451 open ed. Fax (+ 32-70) 346-2026	Ryckebosch, A

PCT/ISA/96 (continued sheet only 1992)

page 1 of 2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Appl. No.  
PCT/FR 96/01552

## C/Continuation DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Character of document, with reference, where appropriate, of the relevant passage	Reference to claim No.
X	INFECTIO AND IMMUNITY, vol. 62, no. 10, October 1994, WASHINGTON US, pages 4526-4533, XP062093746 P. DOIG ET AL.: "IDENTIFICATION OF SURFACE-EXPOSED OUTER MEMBRANE ANTIGENS OF HELICOBACTER PYLORI." see page 4531, right-hand column, line 47 - page 4532, left-hand column, line 12 ---	1,3,5, 7-9
X	INFECTIO AND IMMUNITY vol. 62, no. 4, April 1994, WASHINGTON US, pages 1392-1399, XP062093747 M.A. TUFANO ET AL.: "IMMUNOBIOLOGICAL ACTIVITIES OF HELICOBACTER PYLORI PORINS." see the whole document ---	1,5,7-9
A	EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY & INFECTIOUS DISEASES, vol. 11, no. 6, June 1992, WIESBADEN, DE. pages 522-526, XP062093748 T.U. WESTBLON ET AL.: "CATALASE NEGATIVE MUTANTS OF HELICOBACTER PYLORI." see the whole document ---	1,2
A	FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, vol. 71, 1990, AMSTERDAM, NL, pages 225-230, XP062093833 C.J. LUKE ET AL.: "IDENTIFICATION OF FLAGELLAR AND ASSOCIATED POLYPEPTIDES OF HELICOBACTER (FORMERLY CAMPYLOBACTER) PYLORI." see the whole document ---	1,2,7-9
X	JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 177, no. 19, October 1995, WASHINGTON, D.C., US, pages 5447-5452, XP060579478 P. DOIG ET AL.: "ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A CONSERVED PORIN PROTEIN FROM HELICOBACTER PYLORI." see page 5447, right-hand column, paragraph 2 see page 5449, right-hand column, paragraph 2 - page 5450, left-hand column, paragraph 1 see page 5451, left-hand column, paragraph 3 -----	1,5-9,11

PCT/ISA/96 (continued sheet only 1992)

page 2 of 2

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

#### **Information on action from x sources**

Digitized by srujanika@gmail.com

PCF/FR 96/0155

Patent document used in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A-2669929	85-06-92	DE-A- 4139840 IT-B- 1252164 JP-A- 5264553	11-06-92 05-06-95 12-18-93

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONAUX

Der 4e Internationale N  
PLI/FR 96/0155

PCF/FK 96/81558

Selon la classification internationale des maladies (ICD) ou à la fois selon la classification anatomique et la CIE

#### B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ

Digitized by srujanika@gmail.com

Déterminez ensuite entre quelles deux dates le dépassement mensuel dans la mesure où ces dernières relatives aux dépenses sur lesquelles

[View Details](#)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME MEILLEURS		N° des renvois dans les notes
Category	Indication des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	
X	INFECTION AND IMMUNITY, vol. 63, no. 4, Avril 1995, WASHINGTON US, pages: 1567-1572, XPP02003585 H.M. EXNER ET AL.: "ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A FAMILY OF PORIN PROTEINS FROM HELICOBACTER PYLORI." cité dans la demande voir le document en entier ---	1,3,7-9
A	FR.A.2 669 929 (QUIDEL CORPORATION) 5 Juin 1992 voir le document en entier ---	1-12 -/-

**Votre boîte de réception S'ouvre à l'envoi de tous vos documents**



Elaborado por el Departamento de Investigación y Desarrollo de la Escuela Superior de Ingeniería.

Digitized by srujanika@gmail.com

**22 Janvier 1997**      **05.02.97**

Mme et M. le ministre de l'Administration chargé de la recherche scientifique  
Office Européen des brevets, P.O. 1315 Pessac 33

Ryckebosch, A

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc., 2002.

page 1 de 2

Digitized by srujanika@gmail.com